

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 84100934.3

51 Int. Cl.³: C 07 C 103/52, A 61 K 37/02

22 Anmeldetag: 31.01.84

30 Priorität: 02.02.83 DE 3303345

71 Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

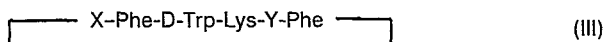
43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 05.09.84
Patentblatt 84/36

72 Erfinder: Friedrich, Axel, Dr., Johannesallee 14,
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)
Erfinder: König, Wolfgang, Dr., Eppsteiner Strasse 25,
D-6238 Hofheim am Taunus (DE)
Erfinder: Teetz, Volker, Dr., An der Tann 20,
D-6238 Hofheim am Taunus (DE)
Erfinder: Geiger, Rolf, Prof. Dr.,
Heinrich-Bleicher-Strasse 33, D-6000 Frankfurt am
Main 50 (DE)
Erfinder: Sandow, Jürgen Kurt, Dr., Am Haideplacken 22,
D-6240 Königstein/Taunus (DE)

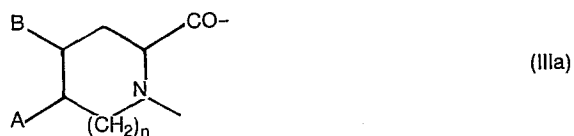
84 Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE

54 Cyclische Peptide mit Somatostatin-Wirkung.

57 Die Erfindung betrifft cyclische Hexapeptide der allgemeinen Formel III



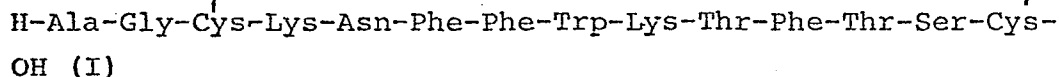
in welcher X für den Rest einer L-Aminosäure der allgemeinen Formel IIIa steht,



wobei A und B gleich oder verschieden sind und Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen bedeuten oder A und B gemeinsam für eine gesättigte, ungesättigte oder aromatische mono- oder bicyclische Struktur mit 3 bis 6 C-Atomen stehen, n = 0 oder 1 bedeutet und Y für eine aliphatische oder aromatische L-Aminosäure steht, deren Seitenkette hydroxyliert sein kann, sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung sowie deren Zwischenprodukte.

Cyclische Peptide mit Somatostatin-Wirkung

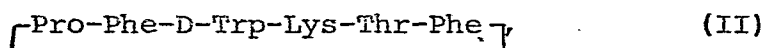
Somatostatin ist ein Peptid aus 14 Aminosäuren der Formel I



- Es wurde sowohl im Hypothalamus (Science 179, 77-79, 1973) als auch im gastrointestinalen Trakt, wie z.B. in den D-Zellen der Pankreasinseln (Acta Physiol. Scand. Suppl. 473, 15, 1979), gefunden. Somatostatin reguliert z.B. durch Hemmung von Insulin oder Glukagon den Blutzuckerspiegel, hemmt Wachstumshormon, TSH, ACTH, Prolaktin, Pankreozymin, Sekretin, Motilin, VIP, GIP und mit Gastrin auch die Magensäuresekretion (Am. J. Med. 70, 619-626, 1981). Mit diesen Eigenschaften könnte es als Therapeutikum vielfältig verwendet werden. Über die gehemmte Ausschüttung von Insulin und Glukagon kann es bei Störungen des Blutzuckerspiegels (z.B. Diabetes) eingesetzt werden. Ein erhöhter Plasma-GH- Spiegel, der z.B. Akromegalie oder Schuppenflechte auslösen kann, wird durch Somatostatin erniedrigt. Durch die gastrinhemmende Wirkung senkt es die Magensäure und heilt die durch überschüssige Magensäure hervorgerufenen Krankheitsbilder, wie z.B. gastrointestinale Blutungen. Hormone produzierende Tumoren, die z.B. dem Verner-Morrison-Syndrom (VIP-produzierender Tumor), oder dem Zollinger-Ellison-Syndrom (gastrinproduzierender Tumor) zugrunde liegen, können mit Somatostatin im Wachstum gehemmt werden.
- 30 Somatostatin wird jedoch sehr leicht metabolisiert und kann daher sinnvoll nur als Infusion appliziert werden. Eine Suche nach stärker und länger wirksamen Somatostatinanaloga ist gerechtfertigt, um die Therapie zu vereinfachen und die Kosten zu senken. Durch die Substitution

von Trp durch D-Trp wurde ein Somatostatinanalogon erhalten, das eine stärkere Wirkung zeigte. Es hemmt die Ausschüttung von Wachstumshormon und Insulin etwa 8 mal und Glukagon etwa 6 mal stärker als Somatostatin

5 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 746-51, 1975). Eine Verkürzung zu einem cyclischen Hexapeptid der Formel II

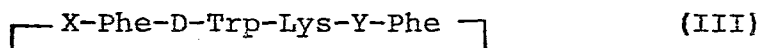


10 in dem zusätzlich zu D-Trp ein Phe durch ein Pro substituiert ist, zeigt bereits eine starke und protrahierte Somatostatin-Wirkung (Nature 292, 55-58 (1981)).

Es wurde nun gefunden, daß durch Substitution des Prolins
15 in Formel II durch lipophilere Heterocyclen die Somatostatin-Wirkung weiter verstärkt werden kann.

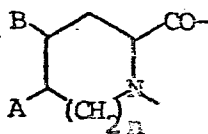
Die Erfindung betrifft cyclische Hexa-Peptide der allgemeinen Formel III,

20



in welcher X für den Rest einer L-Aminosäure der allgemeinen Formel IIIa steht,

25



(IIIa)

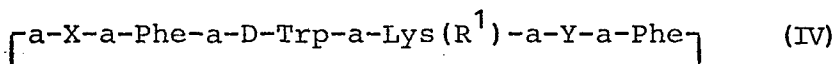
30

wobei A und B gleich oder verschieden sind und Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen bedeuten oder A und B gemeinsam für eine gesättigte, ungesättigte oder aromatische mono- oder bicyclische Struktur mit 3 bis 6 C-Atomen stehen,
35 n = 0 oder 1 bedeuten und

Y für eine aliphatische oder aromatische L-Aminosäure

steht, deren Seitenkette hydroxyliert sein kann, sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man lineare Hexapeptide der allgemeinen Formel IV,



in welcher X und Y die oben genannten Bedeutungen haben, R^1 für eine Schutzgruppe der ϵ -Aminofunktion steht und worin fünf der Reste a eine chemische Bindung bedeuten und einer der Reste a für $-OH+H-$ steht, nach bekannten Verfahren der Peptidsynthese cyclisiert und anschließend vorhandene Schutzgruppen in geeigneter Weise abspaltet.

Unter den oben genannten Peptiden der Formel IV werden im einzelnen die nachstehenden Verbindungen der Formeln IVa-IVf verstanden,

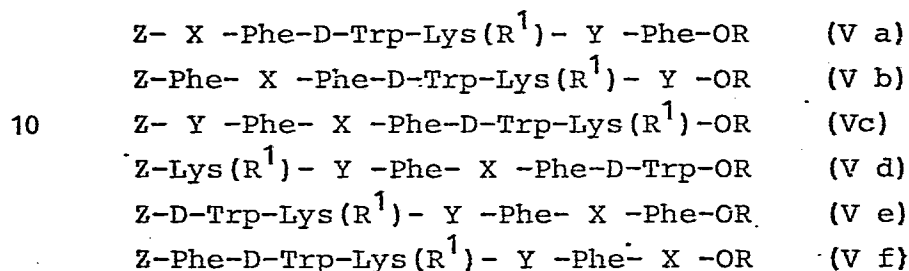
H- X - Phe-D-Trp-Lys(R^1)- Y -Phe-OH (IVa)
 H-Phe- X -Phe-D-Trp-Lys(R^1)- Y - OH (IV b)
 H- Y -Phe- X -Phe-D-Trp-Lys(R^1)-OH (IV c)
 H-Lys(R^1)- Y -Phe- X -Phe-D-Trp-OH (IV d)
 H-D-Trp-Lys(R^1)- Y -Phe- X -Phe-OH (IV e)
 H-Phe-D-Trp-Lys(R^1)- Y -Phe- X - OH (IV f)

in denen R^1 , X und Y die oben genannten Bedeutungen haben.

Die Erfindung betrifft auch lineare Hexapeptide der allgemeinen Formel IV, in denen a, X, Y und R^1 die oben genannten Bedeutungen haben, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Ester der Formel IV, in welcher a, R^1 , X und Y die oben genannten Bedeutungen haben und worin fünf der Reste a eine chemische Bindung bedeuten

und einer der Reste a für -OR+Z- steht, wobei R Alkyl mit 1-6 C-Atomen, vorzugsweise Methyl, bedeutet, alkalisch verseift und anschließend den Z-Rest abhydriert.

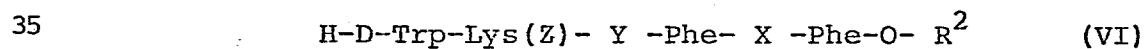
- 5 Unter den Estern der Formel IV werden im einzelnen die Verbindungen der nachstehenden Formeln V a - V f verstanden,



- 15 in denen X, Y, R und R¹ die oben genannten Bedeutungen haben. R¹ steht vorzugsweise für Boc.

20 Die Synthese von Verbindungen der Formeln Va - Vf können sowohl mit Hilfe der Festkörpermethode nach Merrifield als auch auf klassischem Weg in Lösung durchgeführt werden. Standardverfahren sind beispielsweise in "The Peptides Analysis, Synthesis, Biology, Vol.1 Major Methods of Peptide Bond Formation, Part A", ed. E.Gross, J.Meierhofer, Academic Press N.J. (1979) beschrieben.

- 25 Bei einem Cyclohexapeptid gibt es sechs Möglichkeiten um verschiedene Kettenpeptide zum gleichen Cyclopeptid zu cyclisieren. Da Tryptophan während einer sauren Schutzgruppenabspaltung (z. B. Abspaltung der Boc-Gruppe) bei der Festkörpermethode zu Nebenprodukten neigt, ist
 30 es in solchen Fällen zweckmäßig, Tryptophan als letzte Aminosäure aufzusetzen. Nach der Festkörpermethode werden Hexa-Peptide hergestellt, die beispielsweise die allgemeine Formel VI



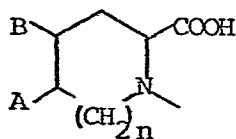
in der X und Y die obige Bedeutung haben und R^2 für das Festkörperharz steht, besitzen. Als Schutzgruppe für die ϵ -Aminofunktion des Lysins dient eine Urethanschützgruppe vorzugsweise der Benzyloxycarbonylrest (Z). Die β -Hydroxygruppe des Threonins kann frei bleiben.

Das über eine Esterfunktion am Harz gebundene Hexapeptid wird mit Hydrazin abgespalten. Es entsteht das entsprechende Hydrazid, das vorzugsweise nach Überführung in das Azid cyclisiert wird. Die geschützten cyclischen Peptide werden chromatographisch gereinigt, wobei auch vorhandene Diastereoisomere getrennt werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen vom Benzyltyp durch katalytische Hydrierung erhält man die erfindungsgemäßen Cyclopeptide.

Bei der klassischen Peptidsynthese dient beispielsweise der durch katalytische Hydrierung abspaltbare Z-Rest oder der durch sekundäre Amine abspaltbare 9-Fluorenylmethyloxycarbonylrest (Fmoc) als Aminoschutzgruppe, während die ϵ -Aminogruppe des Lysins vorzugsweise durch den Boc-Rest geschützt wird. Stufenweise werden Peptide der allgemeinen Formel V a-f aufgebaut.

Durch alkalische Verseifung der Ester (vorzugsweise OMe) entstehen die freien Säuren. Anschließend wird die α -Aminoschutzgruppe abgespalten und die am N- und C-terminalen Ende freien Peptide werden nach den Methoden der Peptidchemie cyclisiert. Die geschützten cyclischen Peptide werden chromatographisch gereinigt. Tert.-Butyl-Schutzgruppen werden vorzugsweise mittels Trifluoressigsäure, der man 1.2-Dimercaptoäthan zusetzt, abgespalten.

Racemische Aminosäuren der Formel III b



(IIIb)

5

in der A, B und n obige Bedeutung haben, sind beispielsweise bekannt aus der EP-A 50 800, der EP-A 31 741, der EP-A 51020, der EP-A 49 658, der EP-A 49 605, der EP-A 29 488, der EP-A 46 953 und der EP-A 52 870. Die Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure ist in J.Amer.Chem. Soc. 70 (1948) 182 beschrieben. Decahydroisochinolin-3-carbonsäure ist aus der EP-A 52 870, 2,3-Dihydro-[1H]-indol-2-carbonsäure aus der US-PS 4 303 583 bekannt. Cis-exo-Octahydro-[1H]-indol-2-carbonsäure, cis, exo-Octahydro-2-cyclopenta[b]pyrrol-2-carbonsäure und cis, exo-Azabicyclo [5.3.0]-decan-3-carbonsäure sind u.a. Gegenstand der deutschen Patentanmeldung P 31 51 690.4. Die deutsche Patentanmeldung P 32 26 768.1 betrifft u.a. cis-endo-Octahydro-cyclopenta[b]pyrrol-2-carbonsäure, P 32 46 503.3 betrifft u.a. cis, endo-Azabicyclo[5.3.0]decan-3-carbonsäure, P 32 10 496.0 betrifft u.a. cis, endo- und cis, exo-2,3,3a,4,5,7a-Hexahydro-[1H]indol-2-carbonsäure, P.33 00 774.8 (HOE 83/F 003) betrifft u.a. Diethylprolin und P 32 42 151.6 betrifft u.a. 3-Azatricyclo [5.2.1.0^{2.6}] decan-4-carbonsäure. Aus der EP-A 37 231 ist cis, endo-Octahydro-[1H]indol-2-L-carbonsäure bekannt. Ein Verfahren zur Racematspaltung von Aminosäuren der Formel IIIb ist Gegenstand der deutschen Patentanmeldung P

30 (HOE 83/F 016).

Eine Aminosäure Y kann beispielsweise L-Alanin, L-Serin, L-Threonin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin oder L-Tyrosin sein.

Als Schutzgruppen R^1 sind die in M. Bodanszky et al. in "Peptide Synthesis", 2. Aufl. (1976), John Wiley & Sons beschriebenen üblichen NH_2 -Schutzgruppen brauchbar. Bevorzugt sind Alkanoyl mit 1-6 C-Atomen, t-Butoxycarbonyl und
5 Benzyloxycarbonyl.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Verbindungen der Formel III als Heilmittel, pharmazeutische Präparate, die diese Verbindungen enthalten, Verfahren zu
10 deren Herstellung und deren Verwendung als Heilmittel.

Die erfindungsgemäßen Peptide haben die hemmenden Eigenschaften des Somatostatins, sie wirken jedoch wesentlich länger bei geringeren Dosen. Z.B. senken diese Peptide
15 an der Ratte nach intravenöser Gabe die Magensäure bei einer ED_{50} von ca. 5 $\mu g/kg$. Die Magensäuresenkung hält über zwei Stunden an. Zum Vergleich dazu hat Somatostatin bei einer i.v.-Dosis von 30 $\mu g/kg$ keinerlei Wirkung auf die Magensäure. Erst eine Somatostatin-Infusion bewirkt
20 eine Senkung der Magensäure. Die ED_{50} bei der Hemmung des Wachstumshormons liegt ebenfalls bei etwa 2-10 $\mu g/kg$ i.v. Im Vergleich mit cyclo-(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe) zeigte z.B. cyclo-(Aoc-Phe-D-Trp-Lys-Val-Phe) in einem Test auf die Potenzierung der blutglucosesenkenden Wirkung des
25 Insulins bei adrenaletomierten Ratten eine mindestens doppelt so starke Wirkung. Das Aoc-Analogon senkte noch bei einer Dosierung von $0,07 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ signifikant die Blutglucose um bis zu 24%, während das Pro-Analogon bereits bei einer Dosierung von $0,318 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ völlig wirkungs-
30 los war. Auch oral und intranasal sind die neuen Verbindungen applizierbar. Wegen der schlechteren Resorbierbarkeit sind hierbei jedoch wesentlich höhere Dosen notwendig.

Wegen der somatostatinartigen Wirkung können die neuen
35 Verbindungen überall dort eingesetzt werden, wo Somatostatininfusionen einen günstigen Effekt zeigen: z.B. bei Blutungen des gastrointestinalen Traktes, bei Magen-

- geschwüren, bei der Behandlung von Tumoren, die durch Somatostatin hemmbare Hormone produzieren, wie z.B. beim Zollinger-Ellison-Syndroms, Verner-Morrison-Syndroms, oder bei Insulin- bzw. Glukagon-produzierenden Tumoren, bei
- 5 hormonabhängigen Tumoren, wenn die entsprechenden Hormone durch Somatostatin hemmbar sind, bei gewissen Leukämiearten, bei Stoffwechselstörungen mit erhöhten durch Somatostatin hemmbaren Hormonspiegeln, wie z.B. der rheumatischen Arthritis, bei der Plasma-Insulin und
- 10 -Wachstumshormon zu hoch sind, bei Akromegalie, Schuppenflechte, bei Diabetes mellitus (Hemmung des Glukagons), beim Chondrosarkom und bei Schockzuständen.

- Eine wirksame Dosis beim Menschen liegt bei parenteraler
- 15 Applikation bei 0,1-10 µg/kg und bei intranasaler Anwendung bei etwa 1-100 µg/kg.
- Da exogen zugeführtes Insulin von Somatostatin nicht gehemmt wird, empfiehlt sich bei Diabetes mellitus ein Kombinationspräparat mit Insulin.

Beispiel 1:

Darstellung der linearen trägergebundenen Boc-Hexapeptide
der allgemeinen Formel Boc-D-Trp-Lys(Z)-Y-Phe-X-Phe-O- R.

5

- 24 g hydroxymethyliertes Merrifield-Harz schlämmt man in
 ca. 360 ml CH_2Cl_2 auf und versetzt die gerührte Suspension
 mit 15.9 g Boc-Phe-OH 12.4 g Dicyclohexylcarbodiimid und
 7.4 g 4-Dimethylaminopyridin. Für möglichst quantitativen
 10 Umsatz läßt man über Nacht reagieren. Der feste Rückstand
 wird abfiltriert und gewaschen (1 x 50 ml CH_2Cl_2 , 4 x 50 ml
 CH_2Cl_2 / Methanol wie 1:1, 2 x 50 ml CH_2Cl_2). Nicht
 blockierte OH-Funktionen am Harz werden dann mit 3 ml
 Benzoylchlorid in 200 ml CH_2Cl_2 und 2.4 ml Pyridin als
 15 Base besetzt. Mit je 4 g dieses mit Boc-Phe-belegten Harzes
 führt man dann eine Festphasensynthese mit den im folgenden
 angegebenen Schritten durch:

	Schritt	Anzahl	Zeit	Menge	Reagenzien
			(min.)	(ml)	
20	1	2	15	40	10 % Trifluoressigsäure / 0,5 % Methansulfonsäure in CH_2Cl_2
	2	2	4	50	Dioxan/ CH_2Cl_2 wie 1:1
25	3	2	4	40	CH_2Cl_2 /Methanol wie 1:1
	4	3	3	50	CH_2Cl_2
	5	3	5	50	10 % Diisopropylethylamin in CH_2Cl_2
	6	5	3	50	CH_2Cl_2
30	7	1	240	60	CH_2Cl_2 , 10 mMol Boc-Amino- säure, 10 mMol Dicyclohexyl- carbodiimid, 10 mMol 1-Hydroxybenzotriazol
	8	4	5	50	CH_2Cl_2 / MeOH 1:1
35	9	2	3	50	CH_2Cl_2

Die Zeitangabe für Schritt 7 wurde meist überschritten, da in der Regel über Nacht stehen gelassen werden mußte.

Die Kontrolle auf Vollständigkeit der Kupplung erfolgte nach Schritt 9 mit Pikrinsäure bzw. Chloranil in Toluol.

- 5 Nach dem letzten Waschen der Stufe 9 wurde das beladene Merrifield-Harz scharf trockengesaugt. Ausbeute: zwischen 5,9 und 6,2 g.

Beispiel 2:

Darstellung der Boc-Hexapeptid-hydrazide der allgemeinen

- 10 Formel Boc-D-Trp-Lys(Z)-Y-Phe-X-Phe-NH-NH₂

6 g trägergebundenes Peptid schlämmt man in 100 ml DMF auf, versetzt mit 5 ml abs. Hydrazinhydrat und läßt

- 15 2 Tage bei Raumtemperatur rühren. Man saugt vom Rückstand ab, wäscht gut mit Dimethylformanid und Methanol und engt das Filtrat zur Trockne ein. Zum vollständigen Entfernen überschüssigen Hydrazins versetzt man mehrfach den Rückstand mit Methanol/Toluol 1:1 und zieht am Rotationsverdampfer wieder ab. Der verbleibende Rückstand wird zur
20 Entfernung von Benzoylhydrazid mehrfach mit wenig Wasser digeriert, schließlich abfiltriert und im Ölpumpenvacuum über P₂O₅ getrocknet. Die Rohausbeuten liegen je nach Peptid zwischen 1,0 und 2,2 g.

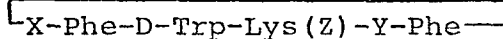
- 25 Die rohen Peptide konnten durch Chromatographie an Kieselgel (LM: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 100:8:5) gereinigt werden.

Beispiel 3:

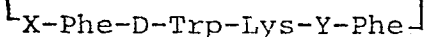
Darstellung der Hexapeptid-hydrazide der allgemeinen

Formel H-D-Trp-Lys(Z)-Y-Phe-X-Phe-NH-NH₂

- 30 1 mMol Boc-Hexapeptid-hydrazid werden in ca. 2 ml Methanol weitgehend gelöst und mit 10 ml 4N HCl in Methanol versetzt. Man läßt unter Wasserausschluß ca. 15 min rühren und engt dann am Rotavapor zur Trockne ein. Die so erhaltenen Hexapeptid-hydrazid-bis-hydrochloride setzt man
35 ohne weitere Charakterisierung sofort in die nächste Stufe ein.

Beispiel 4:Cyclisierung zu Verbindungen der allgemeinen Formel

- 5 1 mMol Hexapeptid-hydrazid-dihydrochlorid werden in 25 ml DMF gelöst. Bei -15°C versetzt man die gerührte Lösung mit 0,67 ml 4N HCl in Dioxan und anschließend mit 0,18 ml Amylnitrit. Man läßt ca. 40 min bei tiefer Temperatur und bringt dann das Reaktionsgemisch in 2 l auf -20°C
- 10 vorgekühltes DMF ein und neutralisiert mit 0,81 ml Diisopropylethylamin. Der gesamte Ansatz verbleibt 2 Tage bei ca. 0°C, dann läßt man auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 3 Tage nach. Der nach Abziehen der Lösungsmittel verbleibende Rückstand wird in Methanol/H₂O wie
- 15 1:1 gelöst und 24 Stunden mit ca. 800 mg Mischbettionen-austauscher gerührt. Nach Abfiltrieren des Ionenaustauschers und Einengen der wässrigmethanolischen Phase verbleibt ein amorpher Rückstand, der durch semipräparative HPLC an Kieselgel (Elutionsmittel: CH₂Cl₂/Ethanol/Essig-
- 20 säure wie 100:5:0,5) gereinigt wird.

Beispiel 5:Darstellung von Cyclopeptiden der allgemeinen Formel

- 25 Zur Abspaltung der ϵ -Z-Schutzgruppe des Lysins löst man die nach HPLC erhaltene Hauptfraktion in Methanol und hydriert ca. 2 Stunden in Anwesenheit von Palladium-Katalysator. Nach Abfiltrieren des Katalysators engt man
- 30 im Vakuum ein und chromatographiert erneut an Kieselgel (Methylenchlorid/Methanol/Essigsäure/Wasser wie 70:30:1, 5:6).

Tabelle 1:

Physikalische Daten für die Boc-Hexapeptidhydrazide

5	X	Y	Aminosäureanalyse				$[\alpha]_D^{23}$ (c= 0,5, Methanol)
			Phe	Lys	X	Y	
	Tic	Thr	2,00	1,03	1,00	0,97	-7,3°
	Oic	Thr	2,00	0,94	0,92	1,03	-15,8°
	Aoc	Thr	1,99	0,97	1,00	1,04	-11,1°

10

Tabelle 2:Charakteristische NMR-Daten (δ -Werte) der cyclischen Ver-
15 bindung der allgemeinen Formel $\text{X-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Y-Phe-}$

20

25

30

X	Y	d, 1H Indol-NH	d, je 1H Amid-NH	d, 1H Indol-CH	d, 1H -OH	s, 2H CH ₂ (Z)	d, 3H CH ₃ (Thr)
Tic	Thr	10,72	8,60 8,59 8,38 7,80	7,54	5,18	5,0	1,08
Oic	Thr	10,80	8,78 8,52 8,08	7,63		5,0	0,95
Aoc	Thr	10,70	8,58 8,38 8,30 7,79	7,47		5,0	1,02

Die Endprodukte der allgemeinen Formel

$\text{X-Phe-D-Trp-Lys-Y-Phe-}$ zeigen bis auf die fehlenden
 35 Signale für die Benzyloxycarbonyl-(Z-)Gruppe die
 gleichen charakteristischen NMR-Daten.

Abkürzungen:

Tic = Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure

Oic = cis-endo-Oktahydroindol-2-carbonsäure

Aoc = cis-Octahydro-cyclopenta[b]-pyrrol-2-endo-carbon-
5 säureBeispiel 6:cyclo-(Aoc-Phe-D-Trp-Lys-Val-Phe)10 a) Z-Phe-Aoc-OBzl

18,5 g des Salzes aus Z-Phe-OH und H-Aoc-OBzl werden
in 100 ml Dimethylformamid gelöst. Dazu gibt man bei 0°C
4,83 g HOBt und 7,0 g DCC. Man rührt eine Stunde bei
0°C und läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der
15 Niederschlag wird anderntags abgesaugt und das Filtrat
eingeeengt. Der Rückstand wird in Essigester gelöst und
nacheinander mit Wasser, gesättigter, NaHCO₃-Lösung, 1 N
H₂SO₄, gesättigter, NaHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüt-
telt. Die Essigesterlösung wird über Na₂SO₄ getrocknet
20 und eingeeengt.

Ausbeute: 16,1 g eines Öls.

Zur Reinigung wird an Kieselgel in Methylenchlorid/
25 Methanol wie 9,7:0,3 (Vol.:Vol.) chromatographiert.

Ausbeute 15,4 g eines hellen Öls. DC: einheitlich in
Methylenchlorid/Methanol (9,7:0,3).

30 b) Z-Phe-Aoc-OH

Zu einer Lösung von 15,4 g Z-Phe-Aoc-OBzl in 60 ml
Dioxan/Wasser wie 8:2 gibt man 14,5 ml 2N NaOH. Man läßt
etwa 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen, neutralisiert
mit 1N H₂SO₄ und engt ein. Der Rückstand wird mit Wasser
35 aufgenommen und die Lösung mit 1N H₂SO₄ auf pH 2-3

angesäuert. Das ausfallende Öl wird mit Essigester extrahiert, die Essigesterlösung wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt.

5 Ausbeute: 13,7 g Öl.

c) Z-Phe-Aoc-Phe-OMe

Zu einer Lösung von 13,7 g Z-Phe-Aoc-OH, 6,77 g H-Phe-OMe·HCl und 4,46 g HOBt in 50 ml Dimethylformamid gibt
10 man bei 0°C 4,02 ml N-Ethylmorpholin und 6,9 g DCC. Man läßt eine Stunde bei 0°C rühren und läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Aufarbeitung analog Beispiel 6a.

Ausbeute: 18,8 g Öl. Nach Reinigung analog 6a:

15 16,0 g helles Öl.

d) H-Phe-Aoc-Phe-OMe·HCl

16,0 g Z-Phe-Aoc-Phe-OMe werden in Methanol gelöst. Man gibt einen 10% Pd-Kohle-Katalysator zu und hydriert am
20 Autotitrator bei pH 4,5. Nach beendigter Hydrierung wird der Katalysator über Kieselgur abgesaugt, das Filtrat eingengt und der Rückstand mit Diethylether verrieben. Der Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet.

25 Ausbeute: 8,67 g, Schmp. 79-91°C, $[\alpha]_D^{23} = +26,9^\circ$ (c=1, Methanol).

e) Z-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe

Zu einer Lösung von 4,0 g H-Phe-Aoc-Phe-OMe·HCl,
30 2,016 g Z-Val-OH und 1,14 g HOBt in 30 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 1,03 ml N-Ethylmorpholin und 1,76 g DC. Man läßt eine Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Aufarbeitung und Reinigung wie bei Beispiel 6a.

35

Ausbeute: 4,2 g Öl.

f. H-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe·HCl

4,95 g Z-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe werden in Methanol gelöst und wie bei d katalytisch hydriert.

5 Ausbeute: 3,31 g (schmierige Substanz).

g. Z-D-Trp-Lys(Boc)-OH

Zu einer Suspension von 11,89 g H-Lys(Boc)-OH in 100 ml Dimethylformamid gibt man 6,87 g HOBt und 25 g Z-D-Trp-OTcp. Man läßt über Nacht rühren und engt ein. Der Rückstand wird dreimal mit Petrolether verrieben und in 3 Stufen zwischen Essigester und gesättigter NaHCO₃ gegenstromverteilt. Die Essigesterphasen werden vereinigt, mit KHSO₄/K₂SO₄-Lösung ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 49,1 g Öl.

Zur weiteren Reinigung wird an 400 g Kieselgel chromatographiert. Zunächst wird mit Methylenchlorid eluiert und die Substanz mit einer Mischung aus Methylenchlorid/Methanol/Wasser (Vol.:Vol.) wie 16:4:0,3 heruntergewaschen. Das Eluat wird eingeengt und am Hochvakuum getrocknet.

25

Ausbeute: 31,1 g amorpher Schaum.

h. Z-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe

Zu einer Lösung von 3,31 g H-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe·HCl, 3,12 g Z-D-Trp-Lys(Boc)-OH und 0,9 g HO St in 20 ml Dimethylformamid gibt man bei 0°C 0,7 ml N-Ethylmorpholin und 1,14 g DCC. Man arbeitet analog Beispiel 6a auf.

Ausbeute: 4,61 g Schmp. 117-119°C, $[\alpha]_D^{23} = -24,2^\circ$ (c=1, Methanol).

35

i. Z-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OH

2,6 g Z-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OMe werden in 25 ml Dioxan/Wasser (8:2) gelöst. Dazu gibt man 5 ml 1N NaOH und läßt 1,5 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Mit 5 1N H₂SO₄ wird neutralisiert und anschließend die Lösung eingeeengt. Der Rückstand wird analog Beispiel 6b aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,2 g, Zers. ab 118°C, $[\alpha]_D^{23} = -25,9^\circ$
10 (c=1, Methanol).

k. H-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OH

2,2 g Z-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OH werden in 90-proz. Essigsäure gelöst und nach Zugabe eines Pd-Kohle-15 Katalysators hydriert. Nach Beendigung der Hydrierung wird der Katalysator über einen Klärschichtfilter abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wird mit Wasser verrieben. Die Suspension (pH 3,1) wird unter Rühren so lange mit NaHCO₃-Lösung (insgesamt etwa 20 2,5 ml) versetzt bis ein pH von etwa 7 erreicht ist. Der Niederschlag wird abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen.

Ausbeute: 1,12 g, $[\alpha]_D^{23} = -43,5^\circ$ (c= 1, Methanol),
25 Zers. ab 168°C

l.cyclo-(Aoc-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe

Zu einer Lösung von 481,8 mg H-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe-Aoc-Phe-OH in 200 ml Dimethylformamid gibt man 0,25 ml 30 Ethyl-methyl-phosphinsäureanhydrid (50-proz.) und unter Rühren langsam eine Lösung von 0,4 ml N-Ethylmorpholin in 10 ml Dimethylformamid. Nach etwa zwei Stunden wird die Lösung eingeeengt und der Rückstand mit Wasser verrieben.

35

Ausbeute: 0,5 g.

Zur Reinigung wird an Kieselgel in Methylenchlorid/
Methanol/Wasser (1800:280:20) chromatographiert.

Ausbeute: 200 mg

m. cyclo-(Aoc-Phe-D-Trp-Lys-Val-Phe

- 5 200 mg cyclo-(Aoc-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Phe) werden in einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Wasser/1,2-Ethandithiol (4,5 ml:0,5 ml:0,5 ml) gelöst. Man läßt 90 Minuten bei Raumtemperatur stehen, engt ein und verteilt den Rückstand zwischen Wasser und Methyl-tert.-butylether.
- 10 Die wäßrige Phase wird mit einem schwach basischen Ionenaustauscher (Acetat) auf pH 3,6 gestellt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 126,7 mg.

15

Aminosäureanalyse: (Hydrolyse: 24 Stdn. bei 120°C in 6N HCl) : Val (0.97), Phe (2,05), Lys (1.00), Aoc (0.95)
(Gehalt an Peptidbase: 81%)

- 20 Trp wird unter diesen Bedingungen zerstört.
Ein UV-Spektrum des Peptids zeigte die für Trp charakteristische Absorption bei 277 nm.

Beispiel 7: Cyclo-(D-Trp-Lys-Thr-Phe-Aoc-Phe)a. Boc-Aoc-Phe-OBzl

5 9,8 g Boc-Aoc-OH, 11,2 g HCl.H-Phe-OBzl, 5,2 g HOBt und
4,9 ml NEM wurden in 100 ml DMF gelöst, mit 7,9 g DCC
versetzt und 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man
saugt vom ausgefallenen DC-Harnstoff ab, dampft in
Vakuum ein, nimmt den Rückstand in 200 ml Essigester
auf und extrahiert mit Citronensäure- und NaHCO₃-Lösung.
10 Beim Einengen der organischen Phase hinterbleibt ein
öliger Rückstand.

Ausbeute: 20 g.

b. H-Aoc-Phe-OBzl . TFAcO

15 20 g Boc-Verbindung aus Beispiel 7a werden in 50 ml Tri-
fluoressigsäure gelöst. Nach 45 Minuten wird in Vakuum
eingeengt. Man erhält wiederum ein Öl.

20 Ausbeute: 22 g

c. Boc-Phe-Aoc-Phe-OBzl

22 g H-Aoc-Phe-OBzl . TFAcOH, 11,5 g Boc-Phe-OH, 5,6 ml
NEM und 5,9 g HOBt wurden in 150 ml Essigester gelöst.
25 Nach Zugabe von 9,0 g DCC läßt man 18 Stunden bei Raum-
temperatur reagieren. Es wurde abgesaugt, die organische
Phase mit Citronensäure und NaHCO₃-Lösung gewaschen,
über festem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und ein-
geengt.

30

Ausbeute: 22,4 g.

d. H-Phe-Aoc-Phe-OBzl . TFAcOH

22,4 g Boc-Verbindung aus Beispiel 7c werden in 50 ml
35 Trifluoressigsäure gelöst. Man engt nach einer Stunde
bei Raumtemperatur ein.

Ausbeute: ca. 23g

e. Z-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Aoc-Phe-OBzl

3,3 g H-Phe-Aoc-Phe-OBzl . TFAcOH, 2,78 g Z-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH, 0,7 g HOBt und 0,7 ml NEM werden in 50 ml Essigester gelöst. Nach Zugabe von 1,07 g DCC läßt man
5 bei RT über Nacht reagieren. Nach Ausschütteln mit Citronensäure und Bicarbonat-Lösung wird getrocknet und eingedampft. Das hinterbleibende braune Öl wird über 400 g Kieselgel (SiO₂-60, Merck AG) im System CHCl₃/MeOH 13:1 filtriert.

10

Ausbeute: 5,1 g

f. H-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Aoc-Phe-OH

5 g Z-Verbindung (Beispiel 7e) wird in 150 ml Methanol
15 gelöst und nach Zugabe von 0,4 g Pd/C (5% Pd) hydriert. Nach Beendigung der Wasserstoffaufnahme wird filtriert und im Vakuum eingeengt. Man chromatographiert über eine Kieselgelsäule im System CHCl₃/MeOH/HAcO 50:20:5.

20 Ausbeute: 2,1 g. Man erhält zwei Verbindungen, die Verbindung mit höherem R_f-Wert wird weiter umgesetzt.

g. Z-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Aoc-Phe-OH

300 mg H-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Aoc-Phe-OH, 190 mg Z-D-
25 Trp-OTcp, 50 mg HOBt und 50 µl NEM werden in 10 ml Essigester gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Man dampft ein und chromatographiert über 150 g Kieselgel (CHCl₃/MeOH 5:1).

30 Ausbeute: 260 mg

h. H-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-OH

260 mg des Z-Derivates (Beispiel 7g) werden in 25 ml MeOH gelöst, mit 100 mg Pd/C versetzt und hydriert. Man
35 filtriert den Katalysator ab und engt im Vakuum ein.

Ausbeute: ca. 240 mg.

i. Cyclo-(D-Trp-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Aoc-Phe

700 mg lineares Peptid (Beispiel 7 h) werden in 25 ml DMF gelöst und unter Rühren mit 350 µl Ethylmethylphosphinsäureanhydrid und 0,1 ml NEM versetzt. Man läßt über
5 Nacht reagieren, dampft in Vakuum ein und chromatographiert den Rückstand über 50 g Kieselgel im System $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 90:15:1.

Ausbeute: 500 mg.

10

j. Cyclo-(D-Trp-Lys-Thr-Phe-Aoc-Phe)

500 mg geschütztes cyclo-Hexapeptid (Beispiel 7 i) wird in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 45 Minuten wird im Vakuum eingeengt und mit Ether gefällt. Man nimmt in
15 wenig Methanol auf und fällt nochmals mit Ether aus.

Ausbeute: 450 mg

Aminosäureanalyse: Lys=1,03; Phe=2,0; Thr=1,01; Aoc=0,99;
Gehalt: 80%

Beispiel 7, Syntheschema

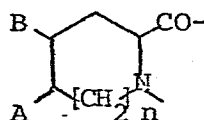
D-Trp	Lys	Thr	Phe	Aoc	Phe
				Boc-OH	H-OBzl
				Boc	OBzl
			Boc-OH	H	OBzl
	Boc Z-OTcp	tBu H-OH	Boc		OBzl
	Boc Z-	tBu -OH	H		OBzl
	Boc Z-	tBu			OBzl
Z-OTcp	H-	tBu			OH
Z-	Boc	tBu			OH
H-	Boc	tBu			OH
cyclo-	Boc	tBu			
cyclo-					

PATENTANSPRÜCHE

1. Cyclisches Hexapeptid der allgemeinen Formel III



5 in welcher X für den Rest einer L-Aminosäure der allgemeinen Formel IIIa steht,



(IIIa)

10

wobei A und B gleich oder verschieden sind und Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen bedeuten oder A und B gemeinsam für eine gesättigte, ungesättigte oder aromatische mono- oder bicyclische Struktur mit 3 bis 6 C-Atomen stehen,
 15 n = 0 oder 1 bedeutet und
 Y für eine aliphatische oder aromatische L-Aminosäure
 20 steht, deren Seitenkette hydroxyliert sein kann, sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

2. Verbindung der Formel III gemäß Anspruch 1, in welcher Y für Thr steht.

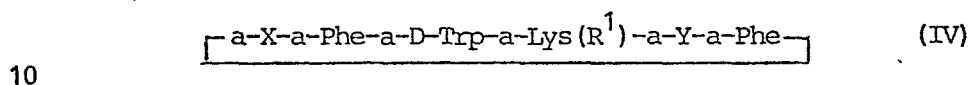
25

3. Verbindung der Formel III gemäß Anspruch 1, in welcher X für den Rest der Tetrahydroisochinolin-3-L-carbonsäure steht.

30 4. Verbindung der Formel III gemäß Anspruch 1, in welcher X für den Rest der cis-endo-Octahydro[1H]indol-2-L-carbonsäure steht.

5. Verbindung der Formel III gemäß Anspruch 1, in welcher X für den Rest der cis, endo Octahydro-cyclopenta[b]pyrrol-2-L-carbonsäure steht.

5 6. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel III, dadurch gekennzeichnet, daß man lineare Hexapeptide der allgemeinen Formel IV



15 in welcher X und Y die im Anspruch 1 definierten Bedeutungen haben, R^1 für eine Schutzgruppe der ϵ -Aminofunktion steht und worin fünf der Reste a eine chemische Bindung bedeuten und einer der Reste a für $-\text{OH} + \text{H}-$ steht, nach bekannten Verfahren der Peptidsynthese cyclisiert und anschließend vorhandene Schutzgruppen in geeigneter Weise abspaltet.

20 7. Hexapeptide der allgemeinen Formel IV, in der a, X, Y und R^1 die in Anspruch 6 definierten Bedeutungen haben.

8. Verwendung von Verbindungen der Formel II gemäß
25 einem der Ansprüche 1-5 als Heilmittel.

9. Pharmazeutische Präparate, enthaltend eine Verbindung der Formel III gemäß einem der Ansprüche 1-5.

30 10. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Anwendung als Heilmittel.

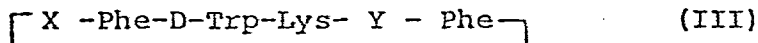
for Austria
für Österreich
pour l'Autriche

- 1 -

HOE 83/F 018

PATENTANSPRÜCHE für Österreich

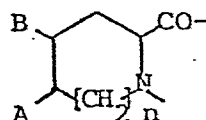
1. Verfahren zur Herstellung eines cyclischen Hexapeptids
der allgemeinen Formel III



5

in welcher X für den Rest einer L-Aminosäure der
allgemeinen Formel IIIa steht,

10



(IIIa)

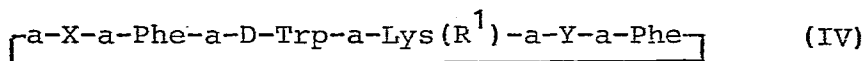
wobei A und B gleich oder verschieden sind und Alkyl
mit 1 bis 3 C-Atomen bedeuten oder A und B gemeinsam
für eine gesättigte, ungesättigte oder aromatische
mono- oder bicyclische Struktur mit 3 bis 6 C-Atomen
stehen,

n = 0 oder 1 bedeutet und

20

Y für eine aliphatische oder aromatische L-Aminosäure
steht, deren Seitenkette hydroxyliert sein kann, sowie
dessen Salzen mit physiologisch verträglichen Säuren,
dadurch gekennzeichnet, daß man lineare Hexapeptide der
allgemeinen Formel IV,

25



30

in welcher X und Y die oben genannte Bedeutung haben,
R¹ für eine Schutzgruppe der ε-Aminofunktion steht und
worin fünf der Reste α eine chemische Bindung bedeuten
und einer der Reste α für -OH + H- steht, nach bekannten
Verfahren der Peptidsynthese cyclisiert und anschließend
vorhandene Schutzgruppen in geeigneter Weise abspaltet.

for Austria
für Österreich
pour l'Autriche

- 2 -

HOE 83/F 018

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß Y für Thr steht.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß
5 X für den Rest der Tetrahydroisochinolin-3-L-carbon-
säure steht.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
10 X für den Rest der cis-endo-Octahydro[1H]indol-2-L-
carbonsäure steht.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
15 X für den Rest der cis, endo-Octahydro-cyclopenta[b]-
pyrrol-2-carbonsäure steht.
6. Verfahren zur Herstellung eines Hexapeptids der Formel IV,
in welcher a, X, Y und R¹ die im Anspruch 1 definierte
Bedeutung haben, dadurch gekennzeichnet, daß man Ester
der Formel IV, in welcher X, Y und R¹ wie oben definiert
20 sind und fünf der Reste a für eine chemische Bindung
und einer der Reste a für -OR + Z stehen, wobei R
Alkyl mit 1-6 C-Atomen bedeutet, alkalisch verseift
und anschließend den Z-Rest abhydriert.
- 25 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5 zur Herstellung
einer Verbindung zur Anwendung als Heilmittel.
8. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präpa-
rats, enthaltend eine Verbindung der Formel III gemäß
30 einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß
man diese in eine geeignete Darreichungsform bringt.

0117447



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 84100934.3
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 3)
Y	<u>EP - A1 - 0 029 310</u> (MERCK & CO. INC.) * Ansprüche 1,5,7,9,10; Seite 27 * --	1,2,6-10	C 07 C 103/52 A 61 K 37/02
D,Y	NATURE, vol. 292, 1981, D.F. VEBER et al. "A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin" Seiten 55-58 * Seiten 56,57 * --	1,2,6-10	
A	<u>EP - A1 - 0 063 308</u> (MERCK & CO. INC.) * Ansprüche 1,6,9 * ----	1,2,6-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 3)
			C 07 C 103/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
WIEN		07-05-1984	PETROUSEK
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			